

(19) C2 (11) 92387 (13) UA

(98) ТОВ "АПП "ВЕПОЛЬ", вул. Герцена, буд. 17-25, офіс 1, м. Київ, 04050

(85) 2008-12-23

(74) null

(45) [2010-10-25]

(43) [2009-03-25]

(24) 2010-10-25

(22) 2007-03-05

(12) Патент України (на 20 р.)

(21) a200813437

(46) 2021-09-15

(86) 2007-03-05 PCT/RU2007/000105

(30) 2006117586 2006-05-23 RU

(54) ПЕПТИД, ЩО МАЄ СТРЕСПРОТЕКТОРНУ ДІЮ, ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ НА ЙОГО ОСНОВІ І СПОСІБ ЇЇ ЗАСТ
ОСУВАННЯ ПЕПТИД, КОТОРИЙ ІМЕЄТ СТРЕСПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ НА ЕГО ОСНОВ
Е И СПОСОБ ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ PEPTIDE EXHIBITING STRESS PROTECTIVE ACTION, PHARMACEUTICAL COMPOSITION BAS
ED THEREON AND USE THEREOF

(56) WANG CHAO ET AL: "The synthesis and immunosuppressive activities of steroid-urotoxin linkers" BIOORGANIC and MEDICINAL CHEM
ISTRY, vol. 12, no. 16, 15 August 2004 (2004-08-15), pages 4403-4421 3

(71) RU ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "СИА ПЕПТАЙДС" RU ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТ
ВЕННОСТЬЮ "СИА ПЕПТАЙДС" RU SIA PEPTIDES, LIMITED LIABILITY COMPANY

(72) RU Хавінсон Владімір Хацкелевіч RU Хавинсон Владимир Хацкелевич RU Khavinson Vladimir Khatskielievich R
U Грігор'єв Євгеній Іосіфовіч RU Григорьев Евгений Иосифович RU Hrihoriev Yevhienii Iosifovich RU Малінін Влад
імір Вікторовіч RU Малинин Владимир Викторович RU Malinin Vladimir Viktorovich RU Рижак Галіна Анатольєвна RU
Рыжак Галина Анатольевна RU Ryzhak Galina Anatolievna

(73) RU ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ПЕПТИДПРО"

Изобретение касается лекарственного средства - пептид глутамил-аспартил-глицин общей формулы: H-Glu-Asp-Gly-OH последовательности 1 [SEQ ID NO:1], которое имеет стресспротекторное действие, для профилактики и лечения функциональных или стресс-индуцированных нарушений, которые возникают при экстремальных воздействиях.

Винахід стосується лікарського засобу - пептид глутаміл-аспартил-гліцин загальної формули: H-Glu-Asp-Gly-OH послідовності 1 [SEQ ID NO:1], що має стреспротекторну дію, для профілактики і лікування функціональних або стрес-індукованих порушень, що виникають при екстремальних впливах.

The invention relates to a medicinal agent peptide glutamyl-aspartyl-glycine with general formula H-Glu-Asp-Gly-OH sequence 1 [SEQ ID NO:1] exhibiting stress protective action for prevention and treatment of functional or stress induced disorders, which occur as a result of extreme impacts.

1. Застосування пептиду глутаміл-аспартил-гліцин загальної формули: H-Glu-Asp-Gly-OH послідовності 1 [SEQ ID NO:1] як агента, що має стреспротекторну дію.
2. Фармацевтична композиція, що має стреспротекторну дію, яка **відрізняється** тим, що як активне начало містить ефективну кількість пептиду глутаміл-аспартил-гліцин загальної формули: H-Glu-Asp-Gly-OH послідовності 1 [SEQ ID NO:1] і фармацевтично прийнятний носій.
3. Фармацевтична композиція за п. 2, яка **відрізняється** тим, що вона знаходиться у формі, що підходить для парентерального або інтраназального введення.
4. Спосіб профілактики і/або лікування функціональних або стрес-індукованих порушень, що виникають при екстремальних впливах, який полягає у введенні пацієнту фармацевтичної композиції, що містить як активне начало ефективну кількість пептиду глутаміл-аспартил-гліцин загальної формули: H-Glu-Asp-Gly-OH послідовності 1 [SEQ ID NO:1] у дозі 0,01-100 мкг/кг маси тіла, принаймні один раз на день протягом періоду, необхідного для досягнення терапевтичного ефекту.
5. Спосіб за п. 4, який **відрізняється** тим, що введення здійснюють внутрішньом'язово або інтраназально крапельно.

Винахід стосується лікарських засобів для профілактики і лікування функціональних або стрес-індукованих порушень, що виникають при екстремальних впливах, і може бути використаний як засіб, що має стреспротекторну дію.

Відомо, що особливістю сучасного життя є стрес, що містить у собі кілька проявів, істотними з яких є: адаптивна реакція організму; недостатньо адаптивна реакція; патологічно залежна адаптивна реакція від стресу; передчасне старіння організму, викликане нервовим, психічним і метаболічним виснаженням.

З рівня техніки невідомі лікарські засоби, що були б ефективні для профілактики і лікування стресу у всіх його проявах.

В залежності від клінічних проявів стресу відоме застосування наступних препаратів: транквілізаторів, антидепресантів, блокаторів бета-адренергічних рецепторів, седативних і гіпнотичних засобів, а також рослинних адаптогенів.

Недоліками цих препаратів є те, що вони застосовні тільки для основного симптоматичного лікування, вони змінюють антистресові реакції адаптації організму і можуть чинити негативний побічний вплив.

Відомі композиції, що включають амінокислоти з вітамінами або без них, або засновані на глутаматах (патент Румунії №76141), або на цистеїні (патент Румунії №74505), аргініні (патент Франції №2494113), або сполуки, що поряд з вищевказаними амінокислотами містять гліцин, лізин, тирозин, орнітин, гістин (патент Франції №5937М, патент Румунії №76044).

До недоліків зазначених композицій можна віднести їхню неспецифічну дію і нездатність сповільнювати старіння організму.

Зазначені вище причини обумовлюють необхідність розробки нових лікарських засобів.

З рівня техніки відомий пептид глутаміл-аспартил-гліцин загальної формули: H-Glu-Asp-Gly-OH (Реєстраційний номер RN-75007-24-8 згідно STN int. BD Registry Chemical abstract).

При експериментальному вивченні пептиду глутаміл-аспартил-гліцин загальної формули: H-Glu-Asp-Gly-OH була виявлено його раніше невідома властивість, що проявляється в наданні стреспротекторної дії.

Даним винаходом поставлена і вирішена задача одержання засобу пептидної природи, що має стреспротекторну дію, фармацевтичної композиції на його основі і способу її застосування.

Технічний результат винаходу полягає в прояві пептидом глутаміл-аспартил-гліцин формули: H-Glu-Asp-Gly-OH стреспротекторної дії, застосування його для виготовлення фармацевтичної композиції, що містить цей пептид як активне начало, використання якого дозволяє регулювати рівень біогенних амінів у корі головного мозку і крові, впливаючи на експресію гена c-fos у різних структурах головного мозку і знижуючи активність енкефаліназ у крові, здійснюючи, таким чином, стреспротекторну дію.

Можливість об'єктивного прояву технічного результату при використанні винаходу підтверджена достовірними даними, наведеними в прикладах, що містять відомості експериментального характеру, отримані в процесі проведення досліджень по методиках, прийнятих у даній галузі, згідно з якими експериментальний стрес індукували у тварин.

Даний винахід стосується пептиду глутаміл-аспартил-гліцин загальної формули: H-Glu-Asp-Gly-OH послідовності 1 [SEQ ID NO:1], що має стреспротекторну дію.

Пропонується застосування пептиду глутаміл-аспартил-гліцин загальної формули: H-Glu-Asp-Gly-OH послідовності 1 [SEQ ID NO:1] для приготування фармацевтичної композиції, що має стреспротекторний ефект.

Наступний аспект даного винаходу стосується фармацевтичної композиції, що має стреспротекторну дію, що характеризується тим, що вона містить як активне начало ефективну кількість пептиду глутаміл-аспартил-гліцин загальної формули: H-Glu-Asp-Gly-OH [SEQ ID NO:1], а також фармацевтично прийнятний носій.

При цьому фармацевтична композиція знаходиться у формі, що підходить для парентерального або інтраназального введення.

Наступний аспект даного винаходу стосується способу профілактики і лікування функціональних або стрес-індукованих порушень, що виникають при екстремальних впливах, що полягає у введенні пацієнту фармацевтичної композиції, що містить як активне начало ефективну кількість пептиду глутаміл-аспартил-гліцин загальної формули: H-Glu-Asp-Gly-OH послідовності 1 [SEQ ID NO:1] у дозі 0,01-100 мкг/кг маси тіла, принаймні, один раз на день протягом періоду, необхідного для досягнення терапевтичного ефекту. При цьому введення здійснюють парентерально або інтраназально.

Пептид глутаміл-аспартил-гліцин загальної формули: H-Glu-Asp-Gly-OH одержують класичним методом пептидного синтезу в розчині.

Вивчення біологічної активності проводили на інтактних тваринах, в експериментальних моделях стресу, з використанням сироватки крові здорових людей і на випробувачах - добровольцях, що піддавалися екстремальному впливу зниженого парціального тиску кисню.

Поняття «фармацевтична композиція», має на увазі різні лікарські форми, що містять новий пептид, що можуть знайти лікувальне застосування в медицині як засіб, що має стреспротекторну дію. Для одержання фармацевтичних композицій, що відповідають винаходу, ефективну кількість пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH як активного начала змішують з фармацевтично прийнятним носієм згідно з прийнятими у фармацевтиці способами компаундування.

Поняття "ефективна кількість", має на увазі використання такої кількості активної речовини, що відповідно до її кількісних показників активності і токсичності, а також на підставі знань фахівця повинна бути ефективною у даній лікарській формі.

Носій може мати різні форми, що залежать від лікарської форми препарату, бажаної для введення в організм.

Для парентерального введення носій звичайно включає фізіологічний розчин або стерильну воду, хоча можуть бути включені інші інгредієнти, що сприяють стабільності, або для збереження стерильності.

Для інтраназального введення носій звичайно включає фізіологічний розчин або стерильну воду, хоча можуть бути включені інші інгредієнти.

Сутність винаходу пояснюється фігурами і таблицею.

На Фіг. 1 показано (у % стосовно контролю) вплив пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH на рівень біогенних амінів

у корі головного мозку щурів (1 - контроль, 2 - пептид H-Glu-Asp-Gly-OH).

На Фіг. 2 (у % стосовно контролю) показаний вплив пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH на рівень біогенних амінів у сироватці крові щурів (1 - контроль, 2 - пептид H-Glu-Asp-Gly-OH).

На Фіг. 3 представлено імуногістохімічне визначення вмісту білка c-Fos у клітинах епіфіза після осмотичного стресу (а - без пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH; б - після інтраназального введення пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH (кластери клітин, що виробляють білок c-Fos).

На Фіг. 4 представлена паренхіма епіфіза після осмотичного стресу (а - без пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH; б - після інтраназального введення пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH).

На Фіг. 5 показаний вплив пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH на енкефаліназну активність сироватки крові людей.

У Таблиці представлений вплив пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH на морфологічні і біохімічні показники периферичної крові морських свинок при вивченні токсичності.

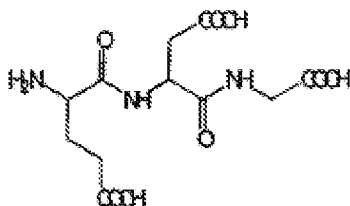
Винахід ілюструється прикладом синтезу пептиду глутаміл-аспартил-гліцин загальної формули: H-Glu-Asp-Gly-OH (приклад 1), прикладами, що підтверджують прояв біологічної активності пептиду (приклади 2, 3, 4, 5), прикладом вивчення токсичності (приклад 6), а також прикладом результатів клінічного застосування пептиду, що демонструє його фармакологічні властивості і підтверджує можливість досягнення профілактичного і/або лікувального ефекту (приклад 7).

Приклад 1. Синтез пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH

1. Назва сполуки: глутаміл-аспартил-гліцин.

2. Структурна формула:

H-Glu-Asp-Gly-OH



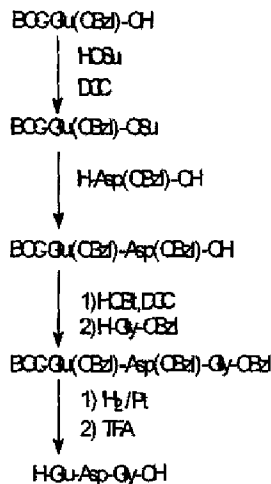
3. Брутто-формула без протиіона: $C_{11}H_{17}N_3O_8$.

4. Молекулярна вага без протиіона: 319,27.

5. Протиіон: ацетат.

6. Зовнішній вигляд: білий аморфний порошок без запаху.

7. Спосіб синтезу : пептид отриманий класичним методом синтезу в розчині за схемою:



Boc - трет.бутилоксикарбонільна група,

OSu - N-оксисукцинімідний ефір,

DCC - N,N'-дициклогексилкарбодіімід,

OBzl - бензиловий ефір,

TFA - трифтороцтова кислота,

HOBT - N-оксибензотриазол.

6. Характеристики готового препарату:

- Вміст основної речовини: 97,93% (по ВЕРХ, 220 нм),

- ТШХ - індивідуальний, $R_f=0,45$ (ацетонітрил-вода 1:2),

- Вміст води: 6%,

- pH 0,01% розчину: 4,9,

- Питоме оптичне обертання: $[\alpha]_D^{22}$: -31° (c=1, H₂O), "Polamat A", Carl Zeiss Jena.

Приклад синтезу:

1) Boc-Glu(OBzl)-OSu, N-оксисукцинімідний ефір N-трет.бутилоксикарбоніл-(γ-бензил)глутамінової кислоти (I).

N-трет.бутилоксикарбоніл-(γ-бензил)глутамінову кислоту Boc-Glu(OBzl)-OH (33,7 г, 0,1 моль) розчиняли в 50 мл N,N'-диметилформаміду, охолоджували до температури -10°C , додавали при перемішуванні

охолоджені (4-6°C) розчини N,N'-дициклогексилкарбодііміду (23,0 г, 0,11 моль) у 30 мл N,N'-диметилформаміду і N-гідроксисукциніміду (13,0 г, 0,11 моль) у 20 мл N,N'-диметилформаміду. Реакційну суміш перемішували протягом 12 год. при охолодженні льодом і далі протягом 1 доби при кімнатній температурі. N,N'-дициклогексилсечовину, що випала, відфільтровували й отриманий розчин активованого ефіру використовували без виділення на наступній стадії.

2) BOC-Glu(OBzl)-Asp(OBzl)-OH, N-трет.бутилоксикарбоніл-(γ-бензил)глутаміл-((3-бензил)аспартат(II)).

(β-Бензил) аспарагінову кислоту H-Asp(OBzl)-OH (28,0 г, 0,12 моль) і 36 мл (0,12 моль) триетиламіну суспендували в 50 мл N,N'-диметилформаміду і перемішували протягом 1 год. Потім додали порціями розчин активованого ефіру BOC-Glu(OBzl)-OSu (I), отриманий на попередній стадії. Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 2 діб. Потім підкисляли 0,5 н сірчаною кислотою до pH 2-3 і екстрагували етилацетатом 4×50 мл. Витяжки поєднували і послідовно промивали 0,5 н H₂SO₄ 3×50 мл, водою 2×50 мл, 5% розчином NaHCO₃ 2×50 мл, водою 2×50 мл, насиченим розчином NaCl 2×50 мл. Органічний шар сушили над Na₂SO₄, упарювали розчинник у вакуумі, залишок кристалізували під гексаном. Отримано 50 г продукту (92%). R_f=0,34 (бензол-ацетон 2:1).

3) BOC-Glu(OBzl)-Asp(OBzl)-Gly-OBzl (III), бензиловий ефір N-трет.бутилоксикарбоніл-(γ-бензил)глутаміл-(β-бензил)аспартил-гліцину (III).

2,7 г (5 ммоль) дипептиду і 0,95 г (7 ммоль) оксibenзотриазолу розчиняли в тетрагідрофурани (10 мл) і охолоджували до температури -10°C. 1,44 г (7 ммоль) дициклогексилкарбодііміду розчиняли в 5 мл тетрагідрофурани і охолоджували до тієї ж температури. 3,4 г (10 ммоль) тозилату бензинового ефіру гліцину розчиняли в 10 мл тетрагідрофурани, додавали 1,4 мл (10 ммоль) триетиламіну і охолоджували до тієї ж температури. При охолодженні на крижаній бані й інтенсивному перемішуванні поєднували розчини дипептиду з оксibenзотриазолом і карбодііміду, через 10 хв. додавали розчин тозилату бензинового ефіру гліцину. Реакційну суміш перемішували протягом 3 год. при охолодженні льодом і протягом 1 доби при кімнатній температурі. Дициклогексилсечовину, що випала, відфільтровували, фільтрат упарювали у вакуумі, залишок розчиняли в етилацетаті (100 мл). Розчин промивали послідовно 0,5 н сірчаною кислотою, водою, 5% розчином бікарбонату натрію, водою, сушили над безводним сульфатом натрію. Етилацетат упарювали у вакуумі, кристалізація залишку в системі етилацетат/гексан. Перекристалізація з ізопропанолу. Отримано після сушіння у вакуумі 2,74 г продукту (85%). R_f=0,78 (бензол-ацетон 1:1).

4) H-Glu-Asp-Gly-OH (IV), глутаміл-аспартил-гліцин.

Захищений трипептид BOC-Glu(OBzl)-Asp(OBzl)-Gly-OBzl (III) (2,7 г) розчиняли в суміші метиловий спирт-вода (4:1) (50 мл) і гідрували над каталізатором Pd/C (5%) протягом 4 год. Каталізатор відфільтровували, розчинник упарювали у вакуумі, залишок сушили у вакуумі над KOH і P₂O₅. Далі продукт розчиняли в 15 мл суміші хлористий метилен-трифтороцтова кислота (5:1) і витримували при кімнатній температурі протягом 2 год. Повноту проходження реакції деблокування контролювали по ТШХ у системі ацетонітрил-вода (1:3). Розчинник упарювали у вакуумі, залишок сушили у вакуумі над KOH.

Для очищення 300 мг препарату розчиняли в 4 мл 0,01% трифтороцтової кислоти і піддавали високоефективній рідинній хроматографії на колонці зі зверненою фазою 50×250 мм Diasorb-130-C16T, 7mkм. Хроматограф Beckman System Gold, 126 Solvent Module, 168 Diode Array Detector Module. Умови хроматографування А: 0,1% TFA; В: MeCN/0,1% TFA, градієнт В 0→50% за 100 хв. Об'єм проби 5 мл, детекція при 215 нм, сканування 190-600 нм, швидкість потоку 10 мл/хв. Відбирали фракцію основного піка. Розчинник упарювали у вакуумі при температурі не вище 40°C, розпарювання багаторазово (5 разів) повторювали з 10 мл 10% розчину оцтової кислоти.

Остаточний залишок розчиняли в 20 мл деіонізованої води і ліофілізували. Отримано 150 мг очищеного препарату у вигляді аморфного білого порошку без запаху.

5) Аналіз готового препарату.

- Вміст основної речовини визначали методом ВЕРХ на колонці Phenomenex C 18 LUNA 4,6×150 мм. А: 0,1% TFA, В: MeCN; grad.В 0-100% in 10 min. Швидкість потоку 1 мл/хв. Детекція при 220 нм, сканування 190-600 нм, проба 20 μl. Вміст основної речовини 97,93%.

- ТШХ: індивідуальний, R_f=0,45 (ацетонітрил-вода 1:2, пластинки ПТШХ-П-В-УФ Sorbfil, силікагель СТХ-1BE 8-12 мкм, проявлення хлор/бензидин).

- Вміст вологи: 6% (гравіметрично по втраті маси при сушінні 20 мг при 100°C).

- pH 0,01% розчину: 4,9 (потенціометрично).

- Питоме оптичне обертання: [α]_D²²: -31° (с=1, H₂O), "Polamat A", Carl Zeiss Jena.

Приклад 2. Вплив пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH на рівень біогенних амінів у корі головного мозку і сироватці крові в щурів

Дослідження проведене на 27 білих щурах обох статей масою 300-320 г.

Пептид H-Glu-Asp-Gly-OH тваринам піддослідних груп вводили внутрішньоочеревинно в дозі 2,5 мкг/кг маси тіла в 0,5 мл стерильного фізіологічного 0,9% розчину NaCl щодня протягом 5 діб.

Щурам контрольної групи за аналогічною схемою вводили стерильний фізіологічний розчин у тому ж об'ємі.

Після закінчення введення препаратів тварин декапітували, потім у корі головного мозку і сироватці крові визначали вміст норадреналіну, дофаміну, 5-оксііндолоцтової кислоти (5-OIOK), серотоніну і гістаміну.

Встановлено, що введення пептиду тваринам сприяло значним зрушенням у рівні біогенних амінів у корі головного мозку і сироватці крові.

Так, після введення пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH щурам у корі головного мозку спостерігалось достовірне збільшення вмісту норадреналіну, дофаміну і серотоніну (Фіг. 1).

При цьому в сироватці крові спостерігалось зниження вмісту дофаміну, серотоніну і гістаміну (Фіг. 2).

Таким чином, у результаті проведеного дослідження встановлено, що пептид H-Glu-Asp-Gly-OH впливає на вміст біогенних амінів у корі головного мозку і сироватці крові, що свідчить про вплив цього пептиду на центральні і периферичні механізми регуляції стресу.

Приклад 3. Вплив пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH на експресію гена c-fos у нейронах паравентрикулярного ядра гіпоталамуса щурів при емоційному стресі

Емоційний стрес підсилює експресію ранніх генів у різних структурах мозку. Відомим маркером активації нейрональних клітин є продукт гена негайної відповіді - c-fos-білок, що виконує функцію посередника між зміною характеру транскрипції під дією стимулу і реалізацією інформаційного сигналу в довгострокові фенотипові зміни. Білки сімейства Fos активуються в нейронах у різний час після надходження стимулу. Так, експресія c-fos мРНК починається вже через кілька хвилин і досягає максимуму через 30-60 хв. після надходження стимулу. Максимальний синтез c-Fos-білка спостерігається між 1-шою і 3-ю годиною, а через 4-6 год. після пред'явлення стимулу відбувається зниження його синтезу в нейронах. Експресія гена c-fos у головному мозку тварин, стійких і схильних до емоційного стресу, різна. Найбільш інтенсивна експресія гена c-fos виявлена в структурах мозку (кора, мигдалина, гіпоталамус і стовбур мозку) у схильних до емоційного стресу щурів. В особин, стійких до емоційного стресу, в аналогічних умовах експерименту експресія гена c-fos визначалася тільки в інфраламбичній корі і нюхових ядрах.

В експерименті вивчали вплив пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH на експресію гена c-fos у паравентрикулярному ядрі гіпоталамуса (PVH) стійких і схильних до емоційного стресу тварин, а також у щурів, підданих емоційному стресу.

Експерименти були проведені на 28 щурах лінії Вістар.

Поведінку тварин попередньо (для прогнозування ступеня їхньої стійкості до емоційного стресу) оцінювали в тесті "відкрите поле". Ефективність застосування пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH вивчали в стійких і схильних до емоційного стресу особин. Пептид H-Glu-Asp-Gly-OH вводили внутрішньоочеревинно в дозах 0,1 і 0,01 мкг на щура в 0,5 мл стерильного фізіологічного 0,9% розчину NaCl через 7-10 днів після першого тесту. Через 1 год. після ін'єкції пептиду тварин піддавали 60-хвилинному емоційному стресу, що створювали, обмежуючи їхню рухливість.

Для ідентифікації клітин, що містять білок Fos - продукт ранньої експресії гена c-fos - провели імуногістохімічне дослідження зрізів мозку з автоматизованим підрахунком Fos-позитивних клітин. Особливості індукції гена c-fos вивчали в PVH.

Число Fos-позитивних клітин у PVH у щурів прогностично стійких до емоційного стресу виявилося вірогідно вищим, ніж у тварин, схильних до емоційного стресу. Це відзначалося в щурів обох контрольних груп (не підданих стресу і після емоційного стресу).

Введення пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH у дозі 0,01 мкг приводило до збільшення кількості Fos-позитивних нервових клітин у щурів, стійких до стресу, що не піддавалися стресорному впливу і на фоні стресу. Навпроти, пептид H-Glu-Asp-Gly-OH у дозі 0,1 мкг сприяв зниженню числа Fos-позитивних нервових клітин у PVH як у стійких, так і в схильних до стресу тварин. На фоні стресу в стійких щурів пептид H-Glu-Asp-Gly-OH у дозі 0,1 мкг збільшував кількість Fos-позитивних нейронів.

Таким чином, були виявлені дозозалежні стреспротекторні ефекти пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH, що проявляються в посиленні експресії гена c-fos і спрямовані на активацію нейронів і формування адаптаційних реакцій.

Приклад 4. Вплив пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH на вміст білка c-Fos в епіфізі щурів при осмотичному стресі

Епіфіз поряд з гіпоталамо-гіпофізарним комплексом залучається у формування множинних адаптаційних відповідей організму на стресорний вплив. При стресі підсилюється продукція епіфізом мелатоніну і речовин пептидної природи, що мають здатність послабляти негативний вплив на організм окисного, осмотичного, психічного й інших видів стресу.

Епіфіз належить до нейрогемальних органів, позбавлених гематоенцефалічного бар'єра, тому він дуже чутливий до високомолекулярних біологічно активних речовин, що циркулюють з мозковим кровотоком, особливо до пептидів. Унікальне положення нюхової системи, хімічний зв'язок одночасно з навколишнім середовищем і з ЦНС дозволяє речовинам неінвазивно проникати в мозковий кровотік і в нейрогемальні органи. Існує постійна дифузія ліквору через підпаутинний простір уздовж факторних нейронів до носової підслизової і носової лімфатичної системи.

В експерименті вивчали вплив пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH при інтраназальному застосуванні на вміст білка c-Fos в епіфізі щурів при стресі. Для імуногістохімічного визначення вмісту білка c-Fos використовували інтактних і підданих 48-годинному осмотичному стресу щурів, яким інтраназально вводили пептид H-Glu-Asp-Gly-OH у дозі 0,5 мкг на тварину в 0,1 мл стерильного фізіологічного 0,9% розчину NaCl (остання інфузія проводилася за 2 год. до взяття матеріалу). У цей же час проводили світлооптичне дослідження стану паренхіми епіфіза у тварин усіх груп.

Білок c-Fos є одним із тригерів, що запускають синтетичні процеси в епіфізі при дії екстремальних факторів, зокрема, при стресі. У наших дослідках майже повна відсутність білка c-Fos в епіфізі щурів при осмотичному стресі, ймовірно, була пов'язана з хронічним характером цього стресу, оскільки найбільший вміст продуктів гена c-fos спостерігається через 1-2 год. після впливу стресорного фактора. Хронічний стрес пригнічує активність гена c-fos у PVH через підвищення в плазмі крові рівня глюкокортикоїдів.

Невелике, але достовірне підвищення вмісту білка c-Fos у пінеалоцитах при стресі спостерігалось тільки після інтраназального введення пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH (Фіг. 3).

Даний ефект пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH спостерігався тільки при стресі. Це свідчить про те, що пептид H-Glu-Asp-Gly-OH бере участь у пептидній саморегуляції діяльності епіфіза при екстремальних станах організму.

Було виявлено, що білок c-Fos нерівномірно міститься в різних пінеалоцитах. При стресі виявляються кластери (по 5-10 клітин), що містять c-Fos у цитоплазмі. Можливо, ці кластери пінеалоцитів є групами клітин, що взаємодіють.

При оцінці стану паренхіми епіфіза було встановлено, розширення капілярів і перикапілярного простору, що виникає при осмотичному стресі (Фіг. 4) частково усувалося інтраназальним введенням пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH.

Таким чином, пептид H-Glu-Asp-Gly-OH впливає на пінеальну залозу при впливі на організм екстремальних факторів. Пептид H-Glu-Asp-Gly-OH перешкоджає патологічним структурним змінам паренхіми епіфіза при осмотичному стресі, і його дія на епіфіз опосередкована активацією системи певних генів.

Приклад 5. Вплив пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH на активність енкефаліназ у сироватці крові людей

Метою даного дослідження було визначення опіоїдної активності пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH. Опіоїдна активність може бути обумовлена як взаємодією пептидів з опіоїдними рецепторами різного типу, так і інгібуванням енкефаліназ, що приводить до відповідного збільшення концентрації нативних енкефалінів.

Здатність пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH впливати на активність ферментів деградації ендегенних опіоїдних пептидів - енкефалінів оцінювали в кінетичних дослідженнях з розщеплення малих концентрацій (0,15 мкМ) [³H]Лей-енкефаліну ферментами сироватки крові людини. Як препарати порівняння використовували загальноприйняті інгібітори енкефаліназ N-карбоксиметил-PhE-Leu (N-CMPL) і бацитрацин. Визначали сумарну енкефаліназну активність сироватки крові, отриманої від 5 здорових донорів, *in vitro*. Результати оцінювали після проведення 4 досліджень.

На Фіг. 5 показаний вплив пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH на енкефаліназну активність сироватки крові людей.

У результаті дослідження встановлено, що пептид H-Glu-Asp-Gly-OH, доданий до культурального середовища в кінцевій концентрації 10 мкг/мл, інгібував активність енкефаліназ сироватки крові (Фіг. 5). Причому ступінь інгібування був порівнянний з таким для N-CMPL (10 мкг/мл) і бацитрацину (50 мкг/мл).

Відомо, що час ферментативної деградації енкефалінів у крові вимірюється хвилинами, тому саме ці ферменти найбільшою мірою визначають периферичні біологічні ефекти ендегенних опіоїдних пептидів. Застосування пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH, що інгібує активність енкефаліназ сироватки крові спрямоване на збереження регуляторних властивостей ендегенних опіоїдних пептидів, що є підставою використання його для корекції стрес-індукованих порушень.

Приклад 6. Вивчення токсичності пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH

Загальнотоксичну дію пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH досліджували відповідно до вимог «Посібника з експериментального (доклінічного) вивчення нових фармакологічних речовин» (2000): гострої токсичності при однократному введенні препарату, а також підгострої і хронічної токсичності при тривалому введенні пептиду.

Дослідження з вивчення гострої токсичності проведено на 66 білих безпородних мишах-самцях масою 20-22 г. Тварини були рандомізовано розділені на 6 рівних груп. Препарат вводили тваринам однократно внутрішньом'язово в дозах 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг у 0,25 мл стерильного 0,9% розчину NaCl. Тваринам контрольної групи в тому ж об'ємі вводили 0,9% розчин NaCl.

Дослідження з вивчення підгострої токсичності проведено на 64 білих безпородних щурах-самцях масою 180-220 г. Щодня однократно тваринам піддослідних груп вводили препарат внутрішньом'язово протягом 90 днів у дозах 1 мг/кг, 0,1 мг/кг, 1 мг/кг у 0,5 мл стерильного 0,9% розчину NaCl. Тваринам контрольної групи вводили в тому ж обсязі стерильний 0,9% розчин NaCl. До введення препарату, на 30, 60 і 90 добу після початку введення препарату у тварин досліджували морфологічний склад і властивості периферичної крові. При завершенні експерименту досліджували біохімічні і коагулологічні показники крові.

Дослідження з вивчення хронічної токсичності проводили протягом 6 місяців, виходячи з тривалості клінічного призначення препарату, що рекомендується, на 92 морських свинках-самцях масою 310-350 г. Тварини піддослідних груп одержували щодня однократно внутрішньом'язово пептид протягом 6 міс. у дозах 1 мг/кг, 0,1 мг/кг, 1 мг/кг у 0,5 мл стерильного 0,9% розчину NaCl. У контрольній групі тваринам вводили за аналогічною схемою стерильний 0,9% розчин NaCl у тому ж обсязі. У тварин у периферичній крові загальноприйнятими методами визначали: кількість еритроцитів, гемоглобіну, ретикулоцитів, тромбоцитів, лейкоцитів, лейкоцитарну формулу, швидкість осідання еритроцитів (ШОЕ), резистентність еритроцитів. Поряд з цим визначали вміст у сироватці крові загального білка по методу Лоурі, калію і натрію методом плазменної спектрофотометрії. Після завершення експерименту проводили патоморфологічне дослідження головного і спинного мозку, спинномозкових гангліїв, щитовидної залози, парашитовидних залоз, надниркових залоз, сім'яників, гіпофіза, серця, легень, аорти, печінки, нирки, сечового міхура, підшлункової залози, шлунка, тонкої кишки, товстої кишки, тимусу, селезінки, лімфатичних вузлів, кісткового мозку.

При вивченні гострої токсичності встановлено, що однократне введення досліджуваного пептиду тваринам в дозі, що перевищує терапевтичну, рекомендовану для клінічного застосування, більш ніж у 5000 разів, не викликає токсичних реакцій, що свідчить про велику терапевтичну широту препарату.

Вивчення підгострої і хронічної токсичності пептиду свідчить про відсутність побічних ефектів при тривалому застосуванні препарату в дозах, що перевищують терапевтичну в 100-1000 разів. При дослідженні впливу пептиду на морфологічний склад крові морських свинок встановлено збільшення кількості лейкоцитів через 3 місяці після початку введення препарату, що нормалізувалося до 6-го місяця спостереження (Таблиця). Інші показники морфологічної сполуки крові тварин практично не змінювалися. Не відзначено достовірного впливу препарату на ШОЕ, резистентність еритроцитів і біохімічні показники сироватки крові.

При оцінці загального стану тварин, морфологічних і біохімічних показників периферичної крові, морфологічного стану внутрішніх органів, стану серцево-судинної і дихальної систем, функції печінки і нирок патологічні зміни в організмі не виявлені.

Відсутність загальнотоксичної дії дозволяє рекомендувати фармацевтичну композицію, що містить як активне начало пептид H-Glu-Asp-Gly-OH, для проведення клінічних досліджень.

Приклад 7. Вплив пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH на функціональний стан людини при впливі зниженого парціального тиску кисню

Для оцінки впливу пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH на функціональний стан і працездатність людини в екстремальних умовах впливу зниженого парціального тиску кисню було обстежено 80 практично здорових чоловіків у віці 20-22 років. Випробувачі були розділені на 3 групи: у контрольну групу ввійшли 20 чоловік, у I і II основні - по 30 чоловік у кожній. У перший день дослідження проводилося фонове обстеження, що включало дослідження дихальної, серцево-судинної і центральної нервової систем.

Після закінчення фонового обстеження випробувачі I основної групи починали приймати фармацевтичну композицію, що містить як активне начало пептид H-Glu-Asp-Gly-OH, інтраназально крапельно, у дозі 5,0 мг в 1 мл фізіологічного розчину (I підгрупа), у дозі 100,0 мкг (II підгрупа) і в дозі 1,0 мкг

у 1,0 мл фізіологічного розчину (III підгрупа) 3 рази на день, протягом 2-х днів. Таким чином, випробувачі I основної групи одержували пептид H-Glu-Asp-Gly-OH інтраназально в дозі 10 мг (I підгрупа), 200 мкг (II підгрупа) і 2 мкг (III підгрупа) на курс.

Випробувачі II основної групи після закінчення фонових обстежень починали приймати фармацевтичну композицію, що містить як активне начало пептид H-Glu-Asp-Gly-OH, внутрішньом'язово в дозі 5,0 мг у 1 мл фізіологічного розчину (I підгрупа), у дозі 100,0 мкг (II підгрупа) і в дозі 1,0 мкг у 1,0 мл фізіологічного розчину (III підгрупа) щодня однократно протягом 2-х днів.

Випробувачі контрольної групи одержували плацебо у вигляді води для ін'єкцій.

На четвертий день експерименту випробувачів трьох груп піддавали впливу гіпоксичної гіпоксії методом «підйому» у барокамері СБК-80 на висоту 5000 м з експозицією 60 хв. без додаткового кисневого забезпечення. До початку підйому, у процесі і після закінчення підйому випробувачів обстежували за скороченою схемою. На п'ятий день дослідження проводилося заключне підсумкове обстеження в повному обсязі. Реактивна тривожність протягом дослідження у всіх випробувачів відповідала рівню помірної тривожності (31-45 балів). Однак у межах цього рівня спостерігалася різнонаправлена динаміка цього показника у випробувачів різних груп. Після дводенного застосування фармацевтичної композиції, що містить як активне начало пептид H-Glu-Asp-Gly-OH у різних дозуваннях, реактивна тривожність у випробувачів знижувалася на 10-13% в залежності від дозування і способу введення фармацевтичної композиції в порівнянні з випробувачами контрольної групи. Наступного дня після впливу гіпоксії реактивна тривожність у випробувачів контрольної групи, що приймали плацебо, була на 9-10% вище вихідних даних, а на тлі застосування фармацевтичної композиції, що містить як активне начало пептид H-Glu-Asp-Gly-OH у різних дозуваннях незалежно від способу введення, відповідала вихідним показникам. Подібну динаміку змін мали показники тесту "САН" (самопочуття, активність, настрій).

В умовах гіпоксичної гіпоксії суб'єктивний стан погіршувався у випробувачів трьох груп, але в різному ступені. В осіб, що приймали фармацевтичну композицію, що містить як активне начало пептид H-Glu-Asp-Gly-OH, суб'єктивний стан залишався на вихідному рівні при внутрішньом'язовому способі введення препарату в різних дозуваннях або погіршувався на 4-5% у випробувачів при інтраназальному способі введення, тоді як в осіб, що приймали плацебо, - на 10-15%. Наступного дня після гіпоксії суб'єктивний стан випробувачів, що приймали фармацевтичну композицію, що містить як активне начало пептид H-Glu-Asp-Gly-OH, був краще вихідних даних на 15% при внутрішньом'язовому способі введення або на 10% при інтраназальному способі введення, тоді як в осіб, що приймали плацебо, на 4-5% гірше. Слід зазначити, що найбільш стабільні показники реєструвалися в осіб, що одержували досліджувану композицію в дозуванні 5,0 мг як при внутрішньом'язовому, так і при інтраназальному способі введення.

Отримані дані свідчать про те, що пептид H-Glu-Asp-Gly-OH впливає на суб'єктивний стан випробувачів, знижуючи емоційні і поведінкові прояви стресу, зменшуючи тривожність, підвищуючи активність, поліпшуючи самопочуття, настрої. Об'єктивно випробувачі, що приймали фармацевтичну композицію, що містить як активне начало пептид H-Glu-Asp-Gly-OH, краще переносили гіпоксичну гіпоксію. Гарна здатність переносити гіпоксію відзначена у 80-90% випробувачів, що приймали пептид H-Glu-Asp-Gly-OH, і тільки у 60% випробувачів, що приймали плацебо.

Динаміка частоти серцевих скорочень (ЧСС) була однаковою в обстежуваних усіх груп. Під дією гіпоксії ЧСС вірогідно зростала: у випробувачів, що приймали фармацевтичну композицію, що містить як активне начало пептид H-Glu-Asp-Gly-OH, - на 10-20% в залежності від дози і способу введення, а в осіб, що приймали плацебо, - на 30-40%. Після закінчення гіпоксичної проби ЧСС у випробувачів, що приймали фармацевтичну композицію, що містить як активне начало пептид H-Glu-Asp-Gly-OH, відповідала вихідним показникам, а у випробувачів, що приймали плацебо, на 6-7% перевищувала їх. Систолічний артеріальний тиск повертався до вихідних даних у випробувачів, що приймали фармацевтичну композицію, що містить як активне начало пептид H-Glu-Asp-Gly-OH, до 10-15-ої хвилини в різних підгрупах, а у випробувачів, що приймали плацебо, тільки після закінчення гіпоксії.

Динаміка зміни діастолічного артеріального тиску у випробувачів була подібною: приріст у перші 10 хвилин дії гіпоксії і поступове зниження надалі. Фізична працездатність наприкінці дослідження зростала в порівнянні з фоновими даними у всіх випробувачів, але в різному ступені. Так, індекс фізичної працездатності (PWC170) і максимальне споживання кисню у випробувачів, що приймали фармацевтичну композицію, що містить як активне начало пептид H-Glu-Asp-Gly-OH, збільшувалися на 15-20% в залежності від дози і способу введення, а в групі плацебо - лише на 10-11%. Особливістю дії пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH виявилася зниження легеневої вентиляції при дозованому фізичному навантаженні після впливу гіпоксії.

З представленого матеріалу видно, що функціональний стан у процесі проведення гіпоксичної проби у випробувачів, що приймали фармацевтичну композицію, що містить як активне начало пептид H-Glu-Asp-Gly-OH у різних дозуваннях, був більш адекватним з фізіологічної точки зору, ніж у випробувачів, що приймали плацебо.

Таким чином, вивчення ефективності застосування пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH, у дослідженнях за участю випробувачів добровольців, що були піддані "підйому" у барокамері на висоту 5000 м без додаткового кисневого забезпечення, показало, що випробувачі, що приймали фармацевтичну композицію, що містить як активне начало пептид H-Glu-Asp-Gly-OH, краще переносили гіпоксичний вплив, як по об'єктивних ознаках, так і суб'єктивно. Виявлений дозозалежний ефект дозволяє рекомендувати застосування досліджуваної фармацевтичної композиції в дозах від 5 мг до 1 мкг у 1 мл фізіологічного розчину як внутрішньом'язово, так і інтраназально в залежності від ступеня порушень функціонального стану випробувачів.

Зміни фізіологічних показників у групі випробувачів, що приймали фармацевтичну композицію, що містить пептид H-Glu-Asp-Gly-OH, були більш згладженими і характеризувалися швидким відновленням до фонових значень, що свідчить про стреспротекторні властивості пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH.

Показник	Введення пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH (1 мкг/кг)			
	3 місяці		6 місяців	
	Контроль (n=24)	Пептид (n=24)	Контроль (n=24)	Пептид (n=24)
Еритроцити, $\times 10^{12}/л$	5,3 $\pm$ 0,6	5,2 $\pm$ 0,1	5,4 $\pm$ 0,3	5,2 $\pm$ 0,7
Гемоглобін, г/л	14,2 $\pm$ 1,4	14,4 $\pm$ 0,9	14,5 $\pm$ 1,3	14,8 $\pm$ 1,1
Ретикулоцити, %	1,3 $\pm$ 0,07	1,1 $\pm$ 0,08	1,1 $\pm$ 0,05	1,2 $\pm$ 0,04
Тромбоцити, $\times 10^9/л$	143,7 $\pm$ 7,9	143,1 $\pm$ 4,5	144,5 $\pm$ 8,6	142,8 $\pm$ 6,2
Лейкоцити, $\times 10^9/л$	9,4 $\pm$ 0,5	11,8 $\pm$ 0,2*	9,6 $\pm$ 0,5	10,3 $\pm$ 0,6
Нейтрофіли паличкоядерні, %	0,31 $\pm$ 0,04	0,30 $\pm$ 0,02	0,33 $\pm$ 0,04	0,35 $\pm$ 0,01
Нейтрофіли сегментоядерні, %	45,8 $\pm$ 2,1	43,9 $\pm$ 1,8	46,2 $\pm$ 3,5	45,4 $\pm$ 3,0
Еозинофіли, %	0,69 $\pm$ 0,05	0,67 $\pm$ 0,06	0,72 $\pm$ 0,04	0,73 $\pm$ 0,04
Базофіли, %	0,61 $\pm$ 0,04	0,63 $\pm$ 0,03	0,72 $\pm$ 0,03	0,65 $\pm$ 0,08
Моноцити, %	2,5 $\pm$ 0,02	2,6 $\pm$ 0,01	2,6 $\pm$ 0,06	2,4 $\pm$ 0,04
Лімфоцити, %	48,9 $\pm$ 2,5	51,3 $\pm$ 2,2	51,3 $\pm$ 2,7	49,7 $\pm$ 1,9
ШОЕ, мм/год.	1,69 $\pm$ 0,05	1,98 $\pm$ 0,09	2,01 $\pm$ 0,05	1,85 $\pm$ 0,06
Резистентність еритроцитів, % NaCl				
- максимальна	0,41 $\pm$ 0,02	0,42 $\pm$ 0,02	0,42 $\pm$ 0,04	0,43 $\pm$ 0,02
- мінімальна	0,32 $\pm$ 0,05	0,31 $\pm$ 0,01	0,34 $\pm$ 0,04	0,33 $\pm$ 0,06
Загальний білок у сироватці крові, г/л	72,9 $\pm$ 3,1	73,6 $\pm$ 2,8	73,1 $\pm$ 3,4	72,3 $\pm$ 2,9
Натрій у сироватці крові ммоль/л	153,9 $\pm$ 5,7	155,6 $\pm$ 4,7	155,5 $\pm$ 6,2	155,2 $\pm$ 4,9
Калій у сироватці крові, ммоль/л	5,1 $\pm$ 2,3	5,3 $\pm$ 2,0	5,2 $\pm$ 2,1	5,1 $\pm$ 2,5

* - P<0,05 у порівнянні з контролем.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Товариство з обмеженою відповідальністю "СІА Рептайдс"

<120> Пептид, що має стреспротекторну дію, фармацевтична композиція на його основі і спосіб її застосування

<130> SIA/02/2006

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial

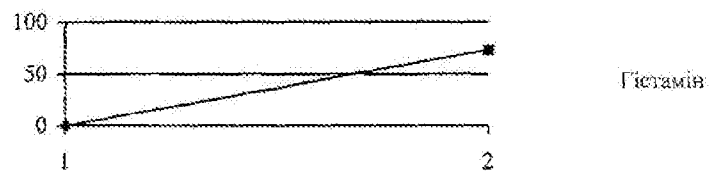
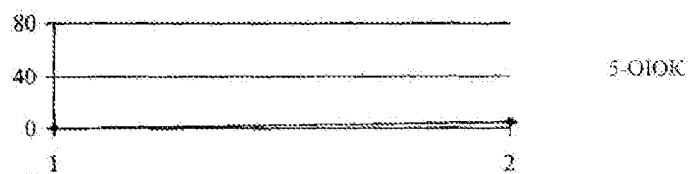
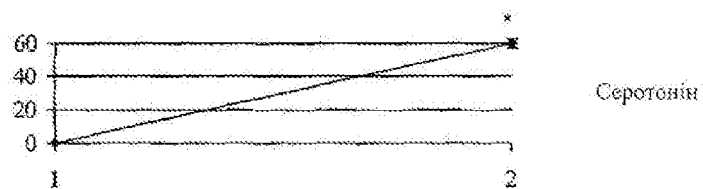
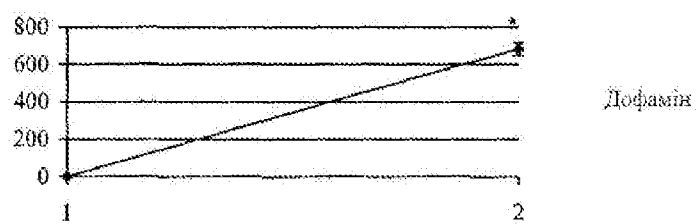
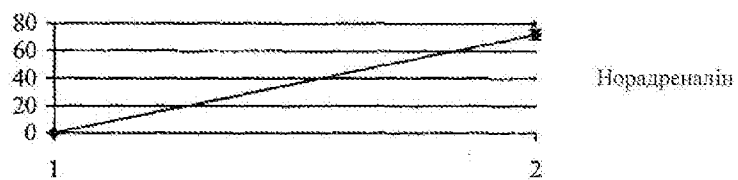
<220>

<223> H-Glu-Asp-Gly-OH має стреспротекторну дію за рахунок регуляції рівня біогенних амінів в корі головного мозку і крові, впливу на експресію генів c-fos у різних структурах головного мозку і зниження активності енкефаліназ в крові

<400> 1

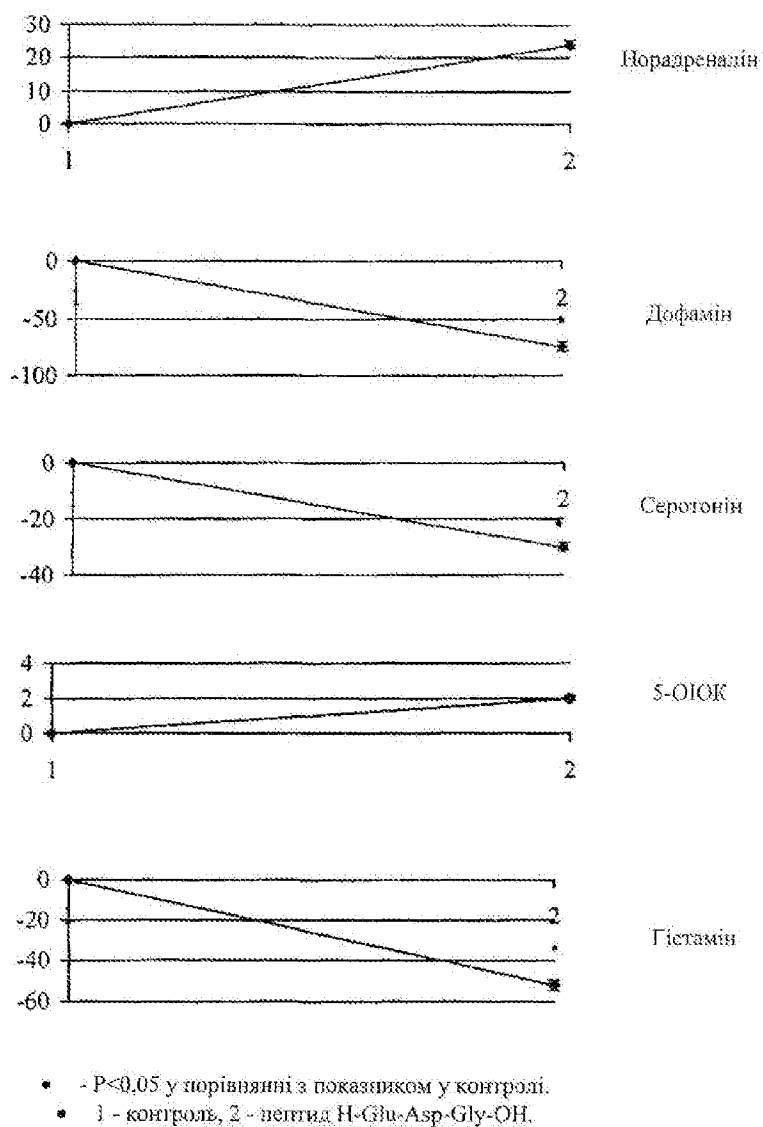
Glu Asp Gly

1



- - $P < 0,05$ у порівнянні з показником у контролі.
- 1 - контроль, 2 - пептид H-Glu-Asp-Gly-OH.

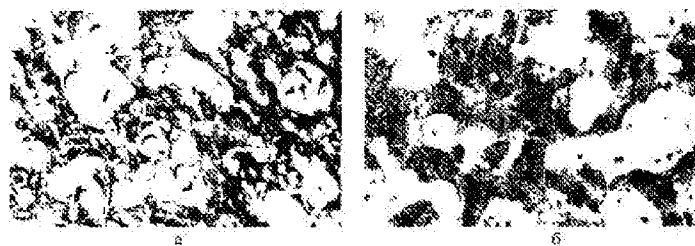
Фіг. 1



Фіг. 2

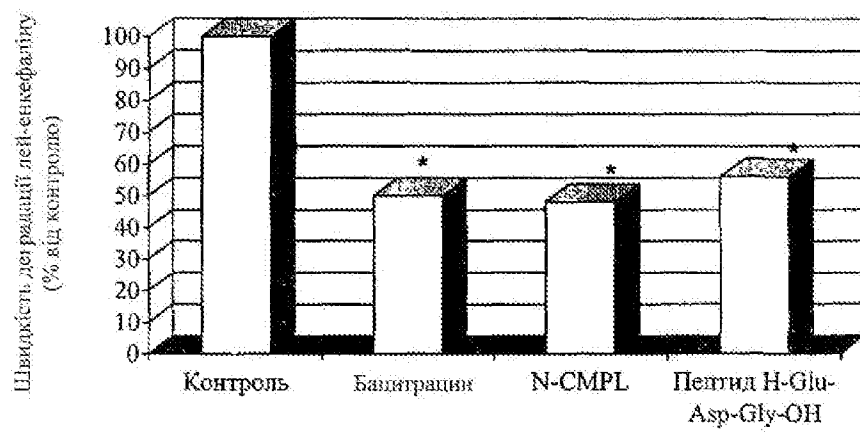


Фіг. 3



а - без введення пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH,
б - після інтраназального введення пептиду H-Glu-Asp-Gly-OH.

Фіг. 4



* - $P < 0,01$ у порівнянні з контролем.

Фіг. 5